Lane Medical Library

Aus der IV. Medizinischen Universitätsklinik
Städtisches Robert-Koch-Krankenhaus
(Direktor: Prof. Dr. H. Dennig)

Der isoelektrische Punkt von menschlichem Hämoglobin

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der

Medizinischen Doktorwürde

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

O-Fang Li
aus Hunan, China

Tag der Promotion: 17. 12. 1935

Druck von Gebr. Hoffmann, Bln.-Charlottenburg, Schillerstr. 44

503

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Magnus.
Referent: Prof. Dr. Dennig
Korreferent: Prof. Dr. v. Bergmann

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Bisher wurden in der Literatur außerordentlich viele und voneinander abweichende Angaben über den isoelektrischen Punkt von Hämoglobin gemacht. Die erste Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Hämoglobin (abgekürzt IP.), und zwar von Hammelhämoglobin, wurde 1910 von Michaelis und Takahashi[1]) ausgeführt. Sie untersuchten die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Hämoglobin-Lösungen, die durch Hämolyse von Erythrocyten gewonnen waren, in Phosphat-Puffer-Gemischen von verschiedenen pH und fanden den IP bei einer H-Ionen-Konzentration von 1.8×10^{-7} Mol/L, d. h. einen pH von 6,75. Campbell und Poulten bestimmten den IP von dialysiertem menschlichem Hämoglobin mit Hilfe von CO_2-Titrationskurven und fanden einen Wert von 6,98. Mit Sicherheit kann man jedoch heute sagen, daß die Voraussetzungen ihrer Bestimmung nicht erfüllt waren. So weiß man z .B. seit den Untersuchungen von Adair, daß sich das Alkali durch einfache Dialyse nur sehr unvollständig entfernen läßt; von den Autoren wurde jedoch angenommen, daß ihre Ausgangslösungen elektrolytfrei waren. Die genaue Kenntnis der in der untersuchten Lösung vorhandenen Alkalimenge ist aber ein entscheidender Faktor bei ihrer Berechnung des IP. Da ihre Lösungen sicher mehr Alkali enthielten als der Berechnung zugrunde gelegt wurde, muß der wirkliche IP viel saurer sein als der von ihnen angegebene. Durch die von Ettisch und Groscurth[2]) mitgeteilte neue Darstellungsmethode reiner nativer Hä-

1) Michaelis u. Takahashi, Bioch. 2, S. 29, 439 (10).
2) Ettisch und Groscurth, Bioch. 2, S. 266, 441 (33).

moglobinlösungen durch Elektrodialyse sind wir heute in die Lage versetzt, mit Aussicht auf Erfolg neue Bestimmungen des IP dieses Eiweißstoffes auszuführen; sie können möglicherweise Ergebnisse erzielen, die nicht in dem Maße früherer Untersuchungen durch die Darstellungsart beeinflußt sind. Eine zweite Möglichkeit zur Erklärung der Widersprüche der bisherigen Ergebnisse kann auf Grund der von Ettisch und Havemann[2]) mitgeteilten Beobachtung gesucht werden, daß der IP von Eiweißlösungen sehr stark von der Konzentration der Lösungen abhängig ist. Von diesen Verfassern wurde auch eine sehr exakte Methode zur Bestimmung des IP angegeben, deren Fehlergrenze und Resultate weit innerhalb der bisherigen Methoden liegen. So konnte auch der Versuch unternommen werden, die Abhängigkeit des isoelektrischen Punktes des menschlichen Hämoglobins von der Konzentration zu untersuchen. Bei der großen theoretischen Bedeutung solcher Messungen, auf die im Zusammenhang dieser Arbeit einzugehen, ihren Rahmen überschreiten würde, kann diesen Untersuchungen nur der Charakter einer vorläufigen experimentellen Abgrenzung der Effekte zugeschrieben werden.

---

1) Ettisch und Havemann, 2 S. u. phys. chem. 174 (35).

Experimenteller Teil:

a) Die Darstellung der Hämoglobinlösungen.

300 bis 500 ccm frisches menschliches Blut, das im allgemeinen aus Aderlässen stammte und durch Zusatz von 0,3 % neutralem Kaliumoxalat ungerinnbar gemacht worden war, wurde 15' bei 4000 Umdr./min. scharf zentrifugiert. Die abgeschleuderten Erythrocyten wurden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und der schließlich erhaltene Erythrocytenbrei durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von ca. 300 ccm verdünnt. Diese Suspension wurde unter Verwendung einer anodischen Glykokoll-Kollodium-Membran und einer kathodischen Pergamentmembran nach der von Ettisch und Groscurth[1]) angegebenen Methode unter Vermeidung von Temperatursteigerungen über 30 °C unter Kühlung in ca. 2—3 Stunden bis zur Elektrolytfreiheit elektrodialysiert. Nach dem Abzentrifugieren der Stromata resultierte eine klare tiefrote Hämoglobinlösung, deren Konzentration durch Bestimmung der Sauerstoffkapazität nach Van-Slyke ermittelt wurde. Die Lösungen wurden im allgemeinen sofort oder nach höchstens 12-stündiger Aufbewahrung im Eisschrank zu den Messungen benutzt. Das pH der so erhaltenen Lösungen lag in der Regel um 6,85.

b) Die Ausführung der Sedimentvolumenversuche.

1 kg reiner, eisenfreier, pulverisierter Quarz wurde in Portionen 5—8 Stunden in einer Kugelmühle trocken ge-

1) Ettisch und Groscurth, e. c.

mahlen und aus dem erhaltenen Mahlgut durch fraktionierte Schlämmung eine homodisperse Fraktion mit einer Teilchengröße von 8—10 μ. Der Sedimentvolumeneffekt — d. i. die Differenz zwischen dem Sedimentvolumen des reinen Quarzes und dem des Quarzes mit dem ζ-Potential Null — nimmt mit abnehmender Teilchengröße zu. Die von uns gewählte Teilchengröße von 8—10 μ besitzt bei ausreichendem Sedimentvolumeneffekt eine erträgliche Sedimentationszeit.

Die Ausführung der IP-Bestimmungen sei an einem Beispiel geschildert:

Es sollte der IP einer 0,50 %igen Oxyhämoglobinlösung bestimmt werden. In zehn in zehntel ccm graduierte Standzylinder von auf $^1/_{100}$ mm gleichem Durchmesser (1 ccm = 1 cm Zylinderhöhe) wurden je 5,0 g des homodispersen Quarzpulvers so genau wie möglich eingewogen. Dann wurden in jedes Röhrchen 13,5 ccm deestilliertes Wasser gegeben und der Quarz durch Schütteln zur Suspension gebracht. Dann ließen wir das Quarzpulver in dem dest. Wasser sedimentieren und bestimmten das Sedimentvolumen des reinen Quarzes in Wasser in jedem einzelnen Gefäß. Bei genau gleicher Einwage — gleichen Querschnitt der Gefäße vorausgesetzt, denn das Sedimentvolumen hängt von der Weite der Gefäße ab — sollte in jedem Zylinder ein übereinstimmendes Sedimentvolumen gefunden werden. Da die Einwage des Quarzes wegen der Größe und der Form der Gefäße nicht auf einer Analysenwage vorgenommen werden konnte, stimmten die abgelesenen Sedimentvolumina jedoch nicht exakt überein. Wie sogleich gezeigt werden soll, ist eine solche exakte Uebereinstimmung jedoch nicht unbedingt erforderlich, wenn die Abweichungen 1 % des Sedimentvolumens nicht übersteigen. Nachdem also so das Null-Volumen des Quarzsediments in jedem Sedimentationsgefäß einzeln bestimmt worden war, wurde das Sediment wieder aufgeschüttelt und in jedes Röhrchen genau 1,50 ccm einer 0,5 %igen Oxyhämoglobinlösung gegeben. Dann wurden den einzelnen Sedimentationsgefäßen tropfenweise

wechselnde Mengen n/100 bezw. n/10 Natronlauge bezw. Salzsäure zugesetzt, z. B. in folgender Verteilung auf die einzelnen Gefäße:

Nr.	1,	2,	3,	4,	5,	6,	7,	8,	9,	10
n/10 NaOH:	1									
n/100 NaOH:		4	2							
				0						
n/100 HCl:					2	4				
n/10 HCl:							1	2	4	8

Tropfen.

Durch diese ungefähr geometrische Progression der Säure- bezw. Alkalizugaben wurde erreicht, daß der pH-Abstand der einzelnen Gefäße immer ungefähr gleich groß war. Durch ständiges vorsichtiges Schütteln sämtlicher Gefäße wurde dann erreicht, daß man den erschütterungsfreien Sedimentationsprozeß in sämtlichen Gefäßen gleichzeitig beginnen lassen konnte. Schon während der Sedimentation hoben sich die „isoelektrischen" oder nahezu „isoelektrischen" Gefäße durch ihre besonders schnelle Sedimentation hervor. Der Sedimentationsverlauf in den weiter vom IP entfernten Lösungen unterscheidet sich außer durch die geringere Sedimentationsgeschwindigkeit noch in der folgenden sehr typischen Weise von der Sedimentation in der isoelektrischen Lösung: In den ersteren grenzt sich noch vor beendigter Sedimentation ein langsam wachsendes, sehr dichtgefügtes Sediment scharf am Boden des Gefäßes ab, während die obere Begrenzung der sedimentierenden Suspension unscharf und verwaschen erscheint. In den isoelektrischen Lösungen ist die Erscheinung genau umgekehrt: Die obere Begrenzung ist scharf, während nur eine gleichmäßige, schwache Erhellung der hellrosa Mischfarbe nach unten die zunehmende Dichte der Suspension in den unteren Schichten andeutet. Sämtliche Uebergänge zwischen die-

sen beiden Extremfällen konnten bei der Ausführung der Versuche beobachtet werden. Nachdem im Verlaufe von 1—2 Stunden die Sedimentation beendet war, wurden schließlich die Sedimentvolumina erneut abgelesen. Von den erhaltenen Sedimentvolumina wurden die jeweils in reinem Wasser erhaltenen abgezogen. Nachdem das pH in jeder Lösung durch Messung mit der Glaselektrode [1]) bestimmt worden war, wurden die so erhaltenen Sediment-Volumen-Differenzen (△SV) gegen pH aufgetragen und aus dem Maximum der erhaltenen Kurve auf den IP geschlossen. Eine solche in einer 0,8 %igen Hämoglobinlösung erhaltene Kurve ist in Abb. 1 dargestellt.

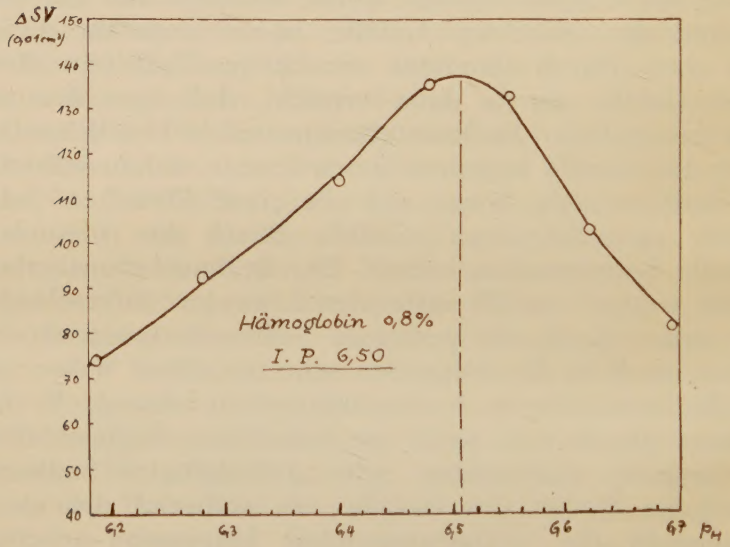

Abb. 1: Das Sedimentvolumen einer homodispersen Quarzsuspension in 0,8 %igen Hämoglobinlösungen verschiedener Acidität.

1) Die Messung der Potentiale geschah mit Hilfe des von Havemann (Ztsch. f. Elektroch.) angegebenen Mikrokapillarelektrometers.

Bei der Betrachtung dieser Kurve kann man erkennen, daß angesichts der Größe des Effekts der 1–2 % betragende Fehler der Quarz-Einwage nicht ins Gewicht fallen kann. Denn es ergibt sich, daß 2 % von ΔSV selbst im Maximum nur 0,02 ccm Fehler hervorrufen würden. Und diese Abweichung liegt schon innerhalb der Ablesegenauigkeit.

Auf diese Weise wurde der IP von menschlichem Oxyhämoglobin in Lösungen von 0,4–2,5 % Hämoglobingehalt bestimmt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse der IP-Bestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt und in Abb. 2 dargestellt:

Tabelle 1.
Der IP von Oxyhämoglobin in Lösungen verschiedener Konzentration.

Konzentration %	IP pH
0,4	6,50 ± 0,01
0,5	6,48 ± 0,02
0,8	6,50 ± 0,02
1,0	6,47 ± 0,02
1,2	6,42 ± 0,02
1,4	6,35 ± 0,03
1,5	6,30 ± 0,01
2,5	6,18 ± 0,01

Die Ergebnisse dieser Messungen sind eine vollkommene Bestätigung der von Ettisch und Havemann für Ovalbumin und Serumalbumin mitgeteilten Ergebnisse für Hämoglobin.

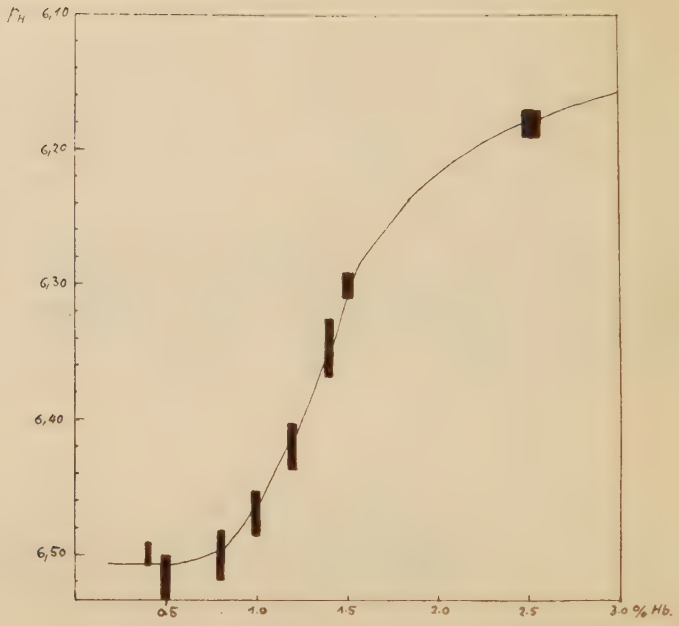

Abb. 2: Der isoelektrische Punkt von menschlichem Oxy-Hämoglobin bei verschiedenen Konzentrationen.

Hiernach liegt die kritische Konzentration für menschliches Oxyhämoglobin bei ca. 0,6 0,7 %. Oberhalb dieser Konzentration zeigen die Lösungen nicht mehr „ideales" Verhalten, sie gehorchen nicht mehr streng den einfachen für ideal verdünnte Systeme geltenden Gleichungen, es treten vielmehr Zusatzglieder auf, die die gegenseitige Beeinflussung und die Raumbeanspruchung der Eiweißmoleküle berücksichtigen müssen.

Die Ergebnisse zeigen an, daß mit zunehmender Konzentration die Dissoziation der sauren Gruppen zunimmt. Ob gleichzeitig eine für den IP nicht maßgebliche Zunahme der Dissoziation der alkalischen Gruppen eintritt, können diese Messungen jedoch nicht angeben. Hierzu bedarf es einer titrimetrischen Untersuchung, die auch

entscheiden kann, ob der beobachtete Effekt durch eine Abnahme der alkalischen Dissoziation bedingt ist. Physiologisch kann die bei der Arbeit infolge der dabei eintretenden Quellung der Erythrocyten hiernach zunehmende „Alkalität" des Hämoglobins die Pufferung der bei der Arbeit gebildeten Säuremengen unterstützen.

Zusammenfassung.

1.. Die großen Abweichungen in den Angaben über den IP von menschlichem Hämoglobin in der bisherigen Literatur werden erklärt durch Verwendung ungeeigneter Darstellungsmethoden und durch die große Fehlergrenze der Bestimmungsmethoden.

2.. Die Anwendung der sehr exakten „Sedimentvolumen"-Methode zur Bestimmung des IP ergibt darüber hinaus, daß der IP von menschlichen Oxyhämoglobinlösungen oberhalb einer Konzentration von 0,6—0,8 % eine Funktion der Konzentration ist.

Für die Anregung zu den vorliegenden Untersuchungen und die Unterstützung bei ihrer Ausführung danke ich den Herren Dr. Groscurth und Dr. Havemann.

Lebenslauf.

Als Sohn eines Lehrers bin ich Li O-Fang am 9. April 1908 in der Stadt Kia-Ho der Provinz Hunan geboren. Von 1913—1917 besuchte ich die Volksschule. 1917 trat ich in das Jali-Gymnasium in Changsha Hunan ein, das ich im Jahre 1926 absolvierte. Die folgenden 2 Jahre widmete ich mich dem Studium der deutschen Sprache an der staatlichen Tung-Chi Universität in Shanghai. Dann studierte ich ab 1928 an der oben genannten Universität Medizin und legte die ärztliche Vorprüfung im Jahre 1930 ab. Im Jahre 1933 bestand ich an derselben Universität das medizinische Staatsexamen. Anschließend arbeitete ich von 1933—1934 an der Inneren Klinik der genannten Universität (Paulum Hospital) als Praktikant und Hausvolontär. Sowohl hier als auch in der Universität waren meine Lehrer ausschließlich deutsche Professoren.

Seit Oktober 1934 bin ich bei der medizinischen Fakultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin immatrikuliert, wo ich jetzt 2 Semester gehört habe. Von Februar bis Juni 1935 habe ich an der 4. med. Universitätsklinik (städt. Robert-Koch-Krankenhaus), unter Leitung von Prof. Dennig eine experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema „Der isoelektrische Punkt von menschlichem Hämoglobin“ gemacht.